

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/68

G01N 33/573 C07K 16/40

C12N 5/12



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02811648.8

[43] 公开日 2004 年 11 月 3 日

[11] 公开号 CN 1543571A

[22] 申请日 2002.4.24 [21] 申请号 02811648.8

[30] 优先权

[32] 2001. 4. 25 [33] US [31] 09/842,079

[32] 2001.10. 4 [33] US [31] 09/971,740

[86] 国际申请 PCT/CA2002/000563 2002. 4. 24

[87] 国际公布 WO2002/088706 英 2002. 11. 7

[85] 进入国家阶段日期 2003. 12. 10

[71] 申请人 SYN. X 医药有限公司

地址 加拿大多伦多

[72] 发明人 乔治·亚茨科夫斯基

米约科·塔卡哈希

[74] 专利代理机构 北京金信联合知识产权代理有
限公司

代理人 张金海

权利要求书9页 说明书17页 附图3页

[54] 发明名称 阿尔茨海默痴呆的鉴别治疗方法及其设备

[57] 摘要

本发明公开了一种阿尔茨海默痴呆(AD)的诊断方法。该方法包括直接检测体液中生化标记物、特别是人谷氨酰胺合成酶的存在,其中体液尤其指血液或血产品。检测是通过结合对人谷氨酰胺合成酶特异的抗体进行免疫测定而实现。此外,还公开了一种区分AD和非-AD痴呆的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

- 1、 一种诊断和鉴别哺乳动物阿尔茨海默痴呆的方法，包括：
从所述哺乳动物获取体液样本；
使所述样本同至少一种与阿尔茨海默疾病的生化标记物明确结
5 合的抗体相接触；
确定所述样本中所述生化标记物的存在； 并
使所述生化标记物的存在与患阿尔茨海默病之间进行关联。
- 2、 一种区分阿尔茨海默痴呆与临床上具有明显痴呆表现的哺
乳动物非 AD-痴呆的方法，包括：
10 从所述哺乳动物获取体液样本；
使所述样本同至少一种对阿尔茨海默病的生化标记物有特异结
合特性的抗体相接触；
测量所述样本中所述生化标记物的水平； 及
使所述生化标记物的所述测量的水平同统计学上阿尔茨海默痴
15 呆和非阿尔茨海默痴呆的该生化标记物的显著水平相关联；
由此鉴别诊断 AD 与非 AD 痴呆。
- 3、 根据权利要求 1 或 2 的方法，其中所述生化标记物是人谷
氨酰胺合成酶。
- 4、 根据权利要求 1 或 2 的方法，其中所述体液样本是血液或
20 任何血产品。
- 5、 根据权利要求 1 或 2 的方法，其中所述抗体是至少一种对
人 GS 呈特异性的单克隆抗体。
- 6、 根据权利要求 1 或 2 的方法，其中所述样本的测定是通过
免疫测定技术进行。
- 25 7、 一种用于诊断和监测阿尔茨海默痴呆病程的试剂盒，包括：
至少一种抗体，该抗体对至少一种表示阿尔茨海默痴呆的标记物
呈特异性，所述抗体或标记物固定于固体载体上；
及至少一与所述标记物结合的标记性抗体；
由此在体液样本上进行至少一种分析，以确定标记物、对其特异

的抗体或它们免疫学上可检测片段的存在。

8、 根据权利要求 7 所述的试剂盒，其中所述标记物是人谷氨酰胺合成酶，所述抗体是至少一种对其特异的单克隆抗体。

9、 根据权利要求 7 所述的试剂盒，其中所述体液样本是血液
5 或一种血产品。

10、根据权利要求 7 所述的试剂盒，其中诊断和监测是在单个体液样本上进行。

11、根据权利要求 7 所述的试剂盒，其中诊断和监测是在多个体液样本上进行，这样，至少一种分析在第一个体液样本上进行且至少
10 另一分析在第二个体液样本上进行。

12、根据权利要求 11 的试剂盒，其中所述第一和第二体液样本是在不同时间段获得。

13、一种编号为 PTA-3339、存放于美国模式培养物保藏所 (American Type Culture Collection) 的杂交瘤细胞系 1G3。

14、一种产自编号为 PTA-3339、存放于美国模式培养物保藏所的杂交瘤细胞系 1G3 的单克隆抗体。
15

15、一种检测样本中人谷氨酰胺合成酶的方法，该方法使用产自编号为 PTA-3339 并存放于美国模式培养物保藏所的杂交瘤细胞系 1G3 的单克隆抗体，该方法包括将样本与单克隆抗体接触以引起样本
20 中谷氨酰胺合成酶和单克隆抗体之间的免疫反应，并检测该免疫反应。

16、一种编号为 PTA-3340、存放于美国模式培养物保藏所的杂交瘤细胞系 5G4。

17、一种产自编号为 PTA-3340 并存放于美国模式培养物保藏所的杂交瘤细胞系 5G4 的单克隆抗体。
25

18、一种检测样本中人谷氨酰胺合成酶的方法，该方法使用产自编号为 PTA-3340 并存于美国模式培养物保藏所的杂交瘤细胞系 5G4 的单克隆抗体，该方法包括将样本与单克隆抗体接触以引起样本中谷氨酰胺合成酶和单克隆抗体之间的免疫反应，并检测该免疫反应。

19、在至少一种动物宿主中产生的抗人谷氨酰胺合成酶的多克隆抗体。

20、一种与人谷氨酰胺合成酶或其免疫学上可检测的片段明确结合的抗体。

5 21、根据权利要求 20 的抗体是单克隆抗体。

22、根据权利要求 20 的抗体是多克隆抗体。

23、根据权利要求 20 的抗体是抗体片段。

24、一种包括权利要求 20 的抗体的诊断试剂盒。

25、一种诊断和监测阿尔茨海默痴呆进程的诊断试剂盒，包括：

10 至少一种产生来抗人谷氨酰胺合成酶的抗体，其对至少一种表示阿尔茨海默痴呆的脑关联标记物呈特异性，所述抗体或标记物固定于固体载体上；

和至少一种与所述标记物结合的标记性抗体；

15 由此在一体液样本上进行至少一种分析，以确定所述标记物、对其特异的抗体或它们免疫学上可检测片段的的存在。

26、一种诊断和监测阿尔茨海默痴呆进程的诊断试剂盒，包括：

至少一种产生来抗人谷氨酰胺合成酶的抗体，其对表示阿尔茨海默痴呆的至少一种脑关联标记物呈特异性，所述抗体或标记物固定于固体载体上；

20 和至少一种与所述标记物结合的标记性抗体；

由此，在血液样本或任何血产品上进行至少一种分析，以确定所述标记物、对其特异的抗体或它们免疫学上可检测片段的的存在。

27、一种诊断和监测阿尔茨海默痴呆进程的诊断试剂盒，包括：

25 至少一种产生来抗人谷氨酰胺合成酶的单克隆抗体，其对至少一种指征阿尔茨海默痴呆的脑关联标记物呈特异性，所述抗体或标记物固定于固体载体上；

和至少一种与所述标记物结合的标记性抗体；

由此，在体液样本上进行至少一种分析，以确定所述标记物、对其特异的抗体或它们免疫学上可检测片段的的存在。

- 28、一种诊断和监测阿尔茨海默痴呆进程的诊断试剂盒，包括：
至少一种产生来抗人谷氨酰胺合成酶的单克隆抗体，其对至少一种指征阿尔茨海默痴呆的脑关联标记物呈特异性，所述抗体或标记物固定于固体载体上；
- 5 和至少一种与所述标记物结合的标记性抗体；
由此在血液样本或任何血产品上进行至少一种分析，以确定所述标记物、对其特异的抗体或它们免疫学上可检测片段的存在。
- 29、一种诊断和监测阿尔茨海默痴呆进程的诊断试剂盒，包括：
至少一种产生来抗人谷氨酰胺合成酶的抗体，其对脑关联人谷氨
- 10 酰胺合成酶呈特异性，所述抗体或脑关联人谷氨酰胺合成酶固定于固体载体上；
和与所述人谷氨酰胺合成酶结合的至少一种标记性抗体；
由此在体液样本上进行至少一种分析，以确定人谷氨酰胺合成酶、对其特异的抗体或它们免疫学上可检测片段的存在。
- 15 30、一种诊断和监测阿尔茨海默痴呆进程的诊断试剂盒，包括：
至少一种对脑关联人谷氨酰胺合成酶特异的抗体，所述抗体或脑关联人谷氨酰胺合成酶固定于固体载体上；
和与所述人谷氨酰胺合成酶结合的至少一种标记性抗体；
由此在血液样本或任何血产品上进行至少一种分析，以对人谷氨
- 20 酰胺合成酶、对其特异的抗体或它们免疫学上可检测片段的存在。
- 31、一种诊断和监测阿尔茨海默痴呆进程的诊断试剂盒，包括：
至少一种对分子量约为 44kDa 的单节显性的脑关联人谷氨酰胺合成酶特异的抗体，所述抗体或脑关联人谷氨酰胺合成酶固定于固体载体上；
- 25 和与所述人谷氨酰胺合成酶结合的至少一种标记性抗体；
由此在体液样本上进行至少一种分析，以确定分子量约为 44KDa 的单节显性的脑关联人谷氨酰胺合成酶、对其特异的抗体或它们免疫学上可检测片段的存在。
- 32、一种诊断和监测阿尔茨海默痴呆进程的诊断试剂盒，包括：

至少一种对分子量约为 44kDa 的单节显性的脑关联人谷氨酰胺合成酶特异的抗体, 所述抗体或脑关联人谷氨酰胺合成酶固定于固体载体上;

和与所述人谷氨酰胺合成酶结合的至少一种标记性抗体;

5 由此在血液样本或任何血产品上进行至少一种分析, 以确定分子量约为 44kDa 的单节显性的脑关联人谷氨酰胺合成酶、对其特异的抗体或它们免疫学上可检测片段的存在。

33、一种诊断和监测阿尔茨海默痴呆进程的试剂盒, 包括:

10 至少一种对分子量约为 44kDa 的单节显性的脑关联人谷氨酰胺合成酶特异的单克隆抗体, 所述抗体或脑关联人谷氨酰胺合成酶固定于固体载体上;

和与所述人谷氨酰胺合成酶结合的至少一种标记性抗体;

15 由此在体液样本上进行至少一种分析, 以确定分子量约为 44kDa 的单节脑关联人谷氨酰胺合成酶、对其特异的抗体或它们免疫学上可检测片段的存在。

34、一种诊断和监测阿尔茨海默痴呆进程的试剂盒, 包括:

至少一种对分子量约为 44kDa 的单节显性的脑关联人谷氨酰胺合成酶特异的单克隆抗体, 所述抗体或脑关联人谷氨酰胺合成酶固定于固体载体上;

20 和与所述人谷氨酰胺合成酶结合的至少一种标记性抗体;

由此在血液样本或任何血产品上进行至少一种分析, 以确定分子量约为 44kDa 的单节显性的脑关联人谷氨酰胺合成酶、对其特异的抗体或它们免疫学上可检测片段的存在。

25 35、一种诊断和鉴别哺乳动物的阿尔茨海默痴呆及其病程的方法, 包括:

从所述哺乳动物获取体液样本;

将所述样本与至少一种选自对至少一种生化标记物蛋白特异的抗体组的抗体或抗体片断相接触, 所述生化标记物蛋白选自由 S-100 蛋白的 β 异构物、神经元特定烯醇化酶 (NSE) 和谷氨酰胺合成酶 (GS)

或它们免疫学上可检测片段组成的组，所述抗体可以被固定在固定载体上；

进一步将所述样本与至少一种标记性抗体接触，其中所述每一种标记性抗体对所述选择的生化标记物蛋白之一具有化合力；

5 由此在体液样本上进行至少一种分析，以确定和测量每个所述标记物、对其特异的抗体或它们免疫学上可检测片段的的存在；

在所述样本中确定每一所选择的生化标记物蛋白的存在；及

将每一所述生化标记物蛋白的存在与阿尔茨海默痴呆的出现相关联。

10 36、一种将阿尔茨海默痴呆与临床上具有明显痴呆表现的哺乳动物的非 AD-痴呆区分开来的方法，包括：

从所述哺乳动物获取体液样本；

15 将所述样本与至少一种选自对至少一种生化标记物蛋白特异的抗体组的抗体或抗体片断相接触，该生化标记物蛋白选自由 S-100 蛋白的 β 异构物、神经元特定烯醇化酶 (NSE) 和谷氨酰胺合成酶 (GS) 或它们免疫学上可检测片段组成的组，所述抗体可以被固定在固定载体上；

测量所述样本中所选择的生化标记物蛋白的水平；及

20 将所述所选择的生化标记物蛋白的所述所测量的水平同统计学上指征阿尔茨海默痴呆和非阿尔茨海默痴呆的显著水平相关联；

由此做出对 AD 与非 AD 痴呆的鉴别诊断。

37、根据权利要求 35 或 36 的方法，其中所述至少一种生化标记物蛋白是人谷氨酰胺合成酶。

25 38、根据权利要求 35 或 36 的方法，其中所述体液样本是血液或任何血产品。

39、根据权利要求 35 或 36 的方法，其中所述至少一种抗体是对人 GS 特异的单克隆抗体。

40、根据权利要求 35 或 36 的方法，其中对所述样本的测定通过免疫测定技术进行。

41、一种诊断和监测阿尔茨海默痴呆病程的诊断试剂盒，包括：
一至三个对三种不同标记物蛋白特异的抗体，所述抗体能固定于
固体载体上，其中

5 a、第一个标记蛋白质是 S-100 蛋白质的 β -异构体，第一抗体
或抗体片段对其呈特异性，

b、第二个标记蛋白质是神经元特异烯醇化酶，第二抗体或抗体
片段对其呈特异性，

c、第三个标记蛋白质是谷氨酰氨合成酶 (GS)，第三抗体或抗体
片段对其呈特异性，

10 d、一至三号标记性抗体，所述标记性抗体的每一个与所述标记
物蛋白质的一种相结合，及

e、将所述三个标记蛋白的每一个与其特异性阈值相比较以确定
其在统计学上显著集中的存在的装置：高于正常水平至少大约二标准
偏差；

15 由此在体液样本上进行至少一种分析，以确定至少一种标记物、
对其特异的抗体或它们免疫学上可检测片段的存在；

其中比较所述三种标记物的所述步骤确定阿尔茨海默痴呆的
发生。

20 42、根据权利要求 41 的试剂盒，其中所述第三种标记蛋白是人
谷氨酰氨合成酶，所述抗体或抗体片段是至少一种对其特异的单克隆
抗体。

43、根据权利要求 41 的试剂盒，其中所述体液样本是血液或任
何血产品。

25 44、根据权利要求 41 的试剂盒，所述诊断和监测是在单个体液
样本上进行。

45、根据权利要求 41 的试剂盒，其中所述诊断和监测是在多个
体液样本上进行，这样，至少一种分析在第一个体液样本上进行且至
少另一分析在第二个体液样本上进行。

46、根据权利要求 45 的试剂盒，其中所述第一和第二体液样本

在不同时间段获得。

47、根据权利要求 35 的诊断和鉴别阿尔茨海默痴呆和其病程的方法，其中

5 所述检测谷氨酰胺合成酶的抗体是产自编号为 PTA-3340 并存于美国模式培养物保藏所的杂交瘤细胞系 5G4 的单克隆抗体或抗体片段。

48、根据权利要求 36 的将阿尔茨海默痴呆与临床上具有明显痴呆表现的哺乳动物的非 AD-痴呆区分开来的方法，其中

10 所述检测谷氨酰胺合成酶的抗体是产自编号为 PTA-3340 并存于美国模式培养物保藏所的杂交瘤细胞系 5G4 的单克隆抗体或抗体片段。

49、根据权利要求 41 的诊断和监测阿尔茨海默痴呆病程的诊断试剂盒，其中

15 所述检测谷氨酰胺合成酶的抗体是产自编号为 PTA-3340 并存于美国模式培养物保藏所的杂交瘤细胞系 5G4 的单克隆抗体或抗体片段。

50、根据权利要求 35 的诊断和鉴别阿尔茨海默痴呆和其病程的方法，其中

20 所述检测谷氨酰胺合成酶的抗体是产自编号为 PTA-3339 并存于美国模式培养物保藏所的杂交瘤细胞系 1G3 的单克隆抗体或抗体片段。

51、根据权利要求 36 的将阿尔茨海默痴呆与临床上具有明显痴呆表现的哺乳动物的非 AD-痴呆区分开来的方法，其中

25 所述检测谷氨酰胺合成酶的抗体是产自编号为 PTA-3339 并存于美国模式培养物保藏所的杂交瘤细胞系 1G3 的单克隆抗体或抗体片段。

52、根据权利要求 41 的诊断和监测阿尔茨海默痴呆病程的诊断试剂盒，其中

所述检测谷氨酰胺合成酶的抗体是产自编号为 PTA-3339 并存于

美国模式培养物保藏所的杂交瘤细胞系 1G3 的单克隆抗体或抗体片段。

53、根据权利要求 35 的方法，所述哺乳动物是人。

54、根据权利要求 36 的方法，所述哺乳动物是人。

5

阿尔茨海默痴呆的鉴别治疗方法及其设备

技术领域

- 5 本发明涉及一种阿尔茨海默痴呆（AD）的诊断方法。本发明尤其涉及一种测量存在至少一种与阿尔茨海默痴呆有关的生化标记的方法。本发明更特别涉及一种临床检测，该测定利用能够对阿尔茨海默痴呆和非阿尔茨海默痴呆进行鉴别诊断的专用抗体进行。

背景技术

- 10 阿尔茨海默疾病，也叫阿尔茨海默痴呆或 AD，是一种进行性的神经变性紊乱，该紊乱能够导致记忆丧失和严重的精神衰退。长期以来诊断专家寻找一种在痴呆患者存活期间可以鉴别确诊 AD 的方式，而不是进行大脑组织的组织病理学检测，后者只是目前对 AD 进行最终诊断的方式。AD 是痴呆最为常见的形式，占有所有痴呆的的一半以上并影响着约 400 万的美国人和全世界接近 1500 万的人。痴呆最初
15 表现为轻度的失忆和精神混乱，随着时间的推移逐渐发展为严重的智力和社会能力的损伤。在 65 岁的年龄段，AD 的社会发病率为 1-2%。到 75 岁，该数值上升到 7%，到 80 岁为 18%。在 65 岁以上的所有个体中，痴呆发病的比率为 8%。对那些属于机关的人来说，任何年
20 龄段的发病率为大约 50%。

- 由于给护理者，尤其在疾病的后期阶段，带来的负担，这种病社会影响巨大。基本的经济费用同维持性的照顾和行政当局的许可大大相关。社会上老年人比例的迅速增加意味着受 AD 影响的个体数量的急剧增长，因此，寻找出一种早期准确诊断和治疗 AD 病的方法正成
25 为世界范围内的重要课题。

当怀疑一个人患有 AD 的时候，建议实行以下几种测试：（1）简易智能状态检查（MMSE）—其是以功能评估调查表（FAQ）为形式的官方心理测验，以检查功能自治的程度；（2）实验室测试—全血球计

数，促甲状腺激素、血清电解质、血清钙和血清葡萄糖水平的测定；

(3) 神经成像——最常用的是计算机断层摄影技术 (CT)，该方法在检测某些病因例如血管性痴呆 (VaD)、肿瘤、常压脑积水和硬膜下血肿引发的痴呆方面发挥作用。但是，神经成像区分 AD 和其他源于正常老化的皮层痴呆的有效性较差。在初期的观察阶段中，一些人建议可将 CT 限制在非典型病例上，但另一些人推荐常规扫描。对大多数痴呆病例，核磁共振成像目前并不优于 CT。

由于阿尔茨海默痴呆是最常见的痴呆形式，至少占病例中的 60%，因此，从多于 80 个不同的病例中，判定痴呆准确起因的诊断程序是最困难的。而且，目前进行的试验不足以对 AD 和其他类型痴呆进行鉴别。

同其他疾病领域相比，由于目前还没有可以应用的有效治疗手段，对于诊断的价值，痴呆病领域提出了许多问题。像其他所有医学的分支一样，确切诊断痴呆病对管理患者有着重要影响。虽然 AD 不能在当前得到治疗，但可行的症状处理方式以及暂时提高识别能力和行为的首选药物（乙酰胆碱酯酶抑制剂）已得到美国食品和药物管理机构的许可。其他药物处于临床试验的不同阶段：(1) 在 AD 中抑制下降的药物，去铁胺、盐酸乙酰 L-肉碱、抗炎症药物、抗氧化剂、雌激素；(2) 神经营养因子：NGF，(3) 疫苗，Schenk 等人最近最令人兴奋的报道 (Natruel1999; 400: 173-7) 增加了 AD 疫苗的希望。

为使治疗获得成功，不同治疗的特异性需要非常有经验的诊断方法学，并需要对 AD 有高度的敏感性。

目前，很多试验都有助于 AD 的诊断。但是，事实上目前唯一的诊断方式是结合痴呆患者的临床史进行死后脑组织病理学检测。这种诊断方式以脑组织中存在神经细胞内神经原纤维缠结神经细胞外老年斑为依据，它们同临床痴呆相关。神经细胞外老年斑由被称作淀粉状 β -蛋白的正常无害的蛋白质构成。在神经元开始死亡和痴呆症状产生以前，在疾病过程的早期出现神经元之间的斑块沉积。神经原纤维缠结是正常成对的螺旋丝组成的神经元的聚集，一般由几种不同的

蛋白质组成。大脑神经元的内部支撑结构依赖于被称作 τ (tau) 的蛋白质的正常功能。在阿尔茨海默病中, τ (tau) 蛋白纤维发生变动, 这导致它们变得扭曲缠绕。神经病理组织的识别和神经细胞外老年斑的计数以及神经原纤维的缠绕, 需要对大脑的几个部分进行染色和微
5 观检测。但是, 这种操作法的结果差异非常大并且消耗时间, 劳动强度增大。

为阻止和/或扭转阿尔茨海默痴呆的开始和/或进程, 在目前和预期的药理学治疗能力下, AD 的早期诊断将更好地帮助安排患者的护理。可能与 AD 痴呆相混淆的非 AD 痴呆有很多例子, 包括小型的未被
10 发现的中风, 该病暂时阻断大脑的血液流动。临床的压抑患者和帕金森疾病患者也经受失忆。许多老人在接受各种药物治疗, 而这些治疗单独或结合起来会产生副作用, 进而损害他们进行认知活动的能力。

因此, 如果能够拥有早期鉴别 AD 的技术, 将提高主治医师们在早期针对疾病发病机理而开出合适的治疗干预处方的能力。

15 针对 AD 的不同生化标记物是广为人知的, 并且测定这种标记物的分析手段也在现有技术中描述过。这里所使用的专业术语“标记物”、“生化标记物”或“标记蛋白”是指任何酶、蛋白质、多肽、肽、它们的同分异构体、它们在免疫学上可检测的片断或在 AD 发病期间从大脑中释放出来的其他分子。这样的标记物包括, 但不限于, 任何
20 与大脑有特定联系的专有蛋白质或它们的同分异构体。

谷氨酰胺合成酶 (GS) 被看作是特异性的星形胶质细胞酶, 该酶与调节氨和在大脑受伤害后过度的谷氨酸新陈代谢有关 (Norenberg 和 Martinex-Hernandez, Brain Res 1979; 161: 303)。关于谷氨酰胺合成酶的临床作用的少量研究已有报道: Gunnensen 和 Haley (Proc
25 Natl Acad Sci USA 1992; 89: 11949) 在 39 个 AD 脑脊髓液 (CSF) 样本的 38 个中发现了单节显性的 GS 蛋白质, Tumani 等人 (Arch Neurol 1999; 56 (10): 1241) 描述了 AD 患者的腰脑脊髓液中 GS 浓度明显地但是非特异性地增加 (即在血管性痴呆 (VaD), 精神分裂症和肌萎缩性 (脊髓) 侧索硬化 (ALS) 症中也增加)。在 1244 页左栏中,

Tumani 说明了在血清中没有发现 GS。

大脑中含量丰富的神经元特异性的 γ -烯醇化酶 (NSE $\gamma\gamma$) 和 S100B 蛋白质也可以用作评价大脑破坏程度的标记物：NSE $\gamma\gamma$ 标记神经元破坏, S100B 标记星形胶质细胞的破坏。源于脑皮层区域的 NSE 和 S100B 蛋白质的浓度已可以通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 的方式检测。研究发现这些蛋白质在 AD 患者的额头皮层的含量水平显著提高 (Kato 等, J Mol Neurosci, 1991; 3 (2): 95)。活性星形细胞过度表达产生 S100B 蛋白与 AD 的 β -淀粉状神经炎斑有紧密联系 (Sheng 等, J Neurosci Res, 1994; 39: 398, Mrak 等, J Neuropathol Exp Neurol, 1996; 55: 273)。

AD 评价中, 生物标记物有许多不同的潜在用途, 并且每一种用途涉及一个不同的标记或一整套标记。这些用途包括, 但不限于, 用标记物将 AD 与其他原因的痴呆区分出来; 用标记物将痴呆与因老化引起的非病理性特征区分出来; 在临床症状显现后监测疾病进程; 利用替代品监测将来 AD 的治疗功效; 将用作 AD 风险评价因素的标记物分离出来; 和识别大脑中最初的生物学变化和疾病过程中发生的其他变化。理想的情况是, 优化分离单一标记物以满足所有高敏感度和高特异性的要求, 但这可能是不切实际的目标。任何标记物个体都需要就其应用到的临床环境类型的敏感度、特异性、可靠性和有效性进行评价。因此若一种标记不足以将 AD 与其他原因的痴呆区分开来, 但仍然是监测疾病过程或治疗反应的出色标记。

关于诊断设备, 临床评价和使用生物标记物的临床检测是评价风险、监测疾病进程和引导治疗干涉的有价值手段。使用生物标记物作为诊断手段的优点包括, 加强临床诊断确定性、将 AD 与其他原因的痴呆相区分、量化疾病的严重程度和进展速度。另外, 使用生物标记物检测迅速、无创性、操作简单并且费用低。

现有技术中缺少的是相对无创性的方法和设备, 从而在活体中有效而精确的诊断阿尔茨海默痴呆。另外, 迫切需要一种对发展中的 AD 的风险进行评价的特异性方法。

现有技术的简述

Haley 的第 5, 445, 937 号美国专利说明了一种阿尔茨海默痴呆的诊断方法，以及诊断和区分其他疾病的手段。该方法通过使用疾病特异性的生化标记物、谷氨酰胺合成酶（GS）和其位于 GS 结合位点的相应亲光标记或 GS 特异性的标记抗体而得以实施。5, 445, 937 号专利专注于检测脑脊髓液（CSF）以监测亲光标记，或标记性抗体、粘5 结蛋白质的核苷的出现，并将所得的水平结果与 AD 的出现相联系。Haley 说明了一系列免疫测定技术以完成这一方法。虽然 Haley 假定预先采用以血液作为样本的诊断方法，并且他进一步提出可以进行单克隆和/或多克隆抗体免疫测定，但他还是没有将二者中的任何一个引入实践。这样，5, 445, 937 号专利仅在说明使用脑脊髓液的诊断试验方面发挥作用。获得脑脊髓液样本要使用使患者非常不适的创伤性技术，并需要较长时间完成。另外，Haley 建议的单克隆和/或多克隆抗体是那些仅仅对羊脑 GS 有特异性的抗体，而不是这里即将提到15 的人类的 GS 重组物形式。

在第 5, 508, 167 号美国专利中，Roses 等人描述了包括检测载脂蛋白 E4（ApoE4）同型物或编码 ApoE4 DNA 的 AD 诊断方法。该方法用血作样本，通过免疫化学测定进行分析。血样有选择地同还原剂结合以将半胱氨酸残液中的二硫键还原为相应的活性的硫氰基。Roses 20 等人进一步描述了检测 ApoE4 的试剂盒。该试验基于三种主要 ApoE4 同型物氨基酸的不同序列。该试验对人类的 GS 没有特异性，在鉴别诊断 AD 和非 AD 痴呆上也不具敏感度。

Tumani 等人（Arch. Neurol., (1999) 56, pp1241-1246）检测了 CSF 中的 GS 水平和血清检测，以确定 GS 是否可用作 AD 诊断。分析通过使用生物素标记的抗羊脑 GS 的单克隆抗体的酶联免疫吸附测定（ELISA）进行。据报道，人体脑脊髓液中和血清中的 GS 浓度正常范围分别是 4pg/mL 和 36pg/mL。AD 患者脑脊髓液样本的 GS 浓度的平均提高水平为 20 ± 12 pg/mL，肌萎缩性脊髓侧索硬化症（ALS）患者的为 13 ± 13 pg/mL，血管性痴呆（VaD）患者的平均提高水平为 13 ± 7 pg/mL。25

血管性痴呆和 ALS 患者表现出较低幅度的增加。AD 患者血清中测量的平均水平为 $111\pm 53\text{pg/mL}$ 。而肌萎缩性脊髓侧索硬化 (ALS) 和血管痴呆也在血清中分别表现出 $116\pm 62\text{pg/mL}$ 和 $72\pm 59\text{pg/mL}$ 的平均提高水平。这样, 关于 AD 痴呆的权威诊断或 AD 同非 AD 痴呆间的鉴别诊断不能从这些测试中得到说明。

Gunnensen 和 Haley (Proc. Natl. Acad. Sci. (1992) 89, pp11949-11953) 提供了在 AD 患者的脑脊髓液中发现 GS 的证据, 但没有提供健康控制主题或对其他疾病控制的证据。考虑之列的其他疾病是癫痫症、ALS 和帕金森症。除 AD 之外的 ALS 患者或脑叶萎缩患者也确实表现出阳性结果, 而同时 ALS 患者不表现出阳性结果, 这表明 GS 是 AD 特定的。其他出版物也提出, 与非人体 GS 相对的抗体可用作 GS 的检测。

一般来说, 大多数学术论文倾向于对肽, 淀粉状 β -蛋白进行研究, 是因为推测它是 AD 的主要决定因素。证据来源于对某些形式 AD 病家族的突变导致淀粉状 β -蛋白过量产生的观察, 尤其是较长形式(1-42)的淀粉状 β -蛋白比较短形式的更容易聚集。Hensley 等人(Proc. Natl. Acad. Sci., (1994) 91, pp3270-3274) 通过聚集状态的 β -淀粉状肽检测了以自由基产生为基础神经毒性。对产生神经毒性的肽的几种合成片断进行测试。似乎氧是基团产生的必要条件并且谷氨酰胺合成酶和肌酸激活酶是氧化敏感的生物标记物, 基于这一事实, 将这些酶的失活作为指示剂指示由片状活性淀粉状 β -蛋白引起的生物分子的激活。

发明概述

本发明涉及一种阿尔茨海默痴呆 (AD) 的诊断方法, 特别涉及一种通过测定体液, 特别是血液、血产品、尿、唾液或类似物质中存在的阿尔茨海默病的特定的生化标记物, 对阿尔茨海默痴呆同其他形式的痴呆进行鉴别诊断的方法。本发明还涉及一种将所存在的同阿尔茨海默痴呆相关的至少一种生化标记物量化的方法。本发明更特别涉及

一种临床检验免疫测定，该测定通过使用专用抗体对阿尔茨海默痴呆同非阿尔茨海默痴呆进行鉴别性的诊断。

本发明涉及诊断、区分类型和监测阿尔茨海默疾病的方法和酶联免疫吸附测定（ELISA）系统。发现 S100B、 γ -烯醇化酶（NSE $\gamma\gamma$ ）和 GS 蛋白质从大脑中释放出来并能从脑外的体液中检测，而该发现是

5 本发明的基础。

描述了人类 GS 重组物的产生和纯化。这些 GS 蛋白质可用于产生单克隆或多克隆抗体，这些抗体能依次用于免疫测定，测定中它们进入能被监测和/或量化的免疫分析中以检测怀疑对象的循环 GS 蛋白质。另外，GS 蛋白质本身可用于免疫检测中以检测怀疑个体中的循环自身抗体。阿尔茨海默痴呆的发生以体液中特定生化标记物的识别水平为特征，所述水平与通过简易智能量表（MMSE）量化的阿尔茨海默痴呆症状表现相关联。作为危险评估测试，这种表示阿尔茨海默痴呆发展情况的标记物的水平识别进一步增加了有经验的实践者的诊断能力。

10 15

因此，本发明的一个目标是提供一种相对无创性并高敏感性的阿尔茨海默痴呆决定性诊断的方法。

本发明的另一个目标是提供一种方法，该方法包括分析患者的至少一种体液以确定至少一种特征 AD 痴呆和非 AD 痴呆的标记物的存在。

20

本发明的另一个目的是，通过本发明的方法提供一种可通过本发明方法识别的神经元相关蛋白质的特异性抗体。

本发明进一步的目的是提供一种有效识别人体一种或多种体液中神经元特异性蛋白的免疫分析法。

本发明的又一个目的是提供一种特异于人谷氨酰胺合成酶（GS）的纯化的单克隆抗体。

25

本发明的再一个目的是提供一种包括无创性临床检验的 AD 诊断检测试剂盒，该试剂盒可使用包括血或其他任何血产品的样本来进行测试。

本发明的其他目的和优点将在下面的描述中变得更为明显，下列描述将结合相应列出的图表，并通过插图和例子以及本发明的某些实施方式加以说明。这些图表构成了说明书的一部分，包括了本发明的实施方式并举例说明了它们的不同目的和特征。

5 附图说明

图 1 是临床评估正患有有一种阿尔茨海默痴呆的一群患者的血液中，GS、NSE 和 S100 的统计学上显著有效值的比较；

图 2 是临床评价正患有有一种非阿尔茨海默痴呆的一群患者的血液中，GS、NSE 和 S100 的统计学上显著有效值的比较；

10 图 3 是健康人中相对于年龄的 GS 描述性柱形图。

具体实施方式

根据本发明的方法，被分析的标记物释放到血液循环中并可能会出现在血液或其他任何血产品中，通过例如低渗缓冲器或清洁剂处理并稀释和制备的例如血浆、血清和组织溶解血等，和其他体液例如脑
15 脊髓液、唾液、尿、淋巴液和类似物质中。另一个优选的实施方式中可以测定脑脊髓液中标记物的浓度。

术语“正常以上”和“断点以上”是指标记物水平高于不患有脑疾病（例如大脑退化和萎缩）的正常个体中所能观察到的标记物水平以上的标记水平。对一些标记物来说，出现在个体血液里的非常低的
20 标记水平可能是正常的。根据本发明分析的其他标记，可以检测到的水平可能正常地出现在血液中。因此，这些术语表示一种显著高于健康个体里发现的正常水平的水平。术语“显著地”或“统计显著地”是指统计上的显著性并一般指相当于或高于标记物正常浓度二个标准方差。进行任何标记蛋白分析的分析方法必须敏感以便能够检测到
25 出现的高于所关注的浓度范围的标记物水平，并必须是高度特异性的。

为评价它们作为诊断工具的价值而进行比较的三个标记物是大脑中由特定细胞释放出来的蛋白质，原因是这些细胞在大脑活动中受

到了破坏。这些标记物（即蛋白质）可以是它们的自然形式，或者它们可以是由于蛋白分解作用（例如蛋白水解）下产生的免疫学上可检测的蛋白质片断。“免疫学上可检测的”是指标记片断包含一个能被用于检验的抗体试剂特异性识别的抗原决定基。

5 根据本发明方法分析的标记物是细胞类型特异性的。烯醇化酶对糖酵解路径下的 2-磷酸甘油酸和磷酸烯醇化丙酮酸的相互转换起催化作用。烯醇化酶存在于三个同工蛋白质中，其每个都为分离基因的产品。基因部位指定为 ENO1、ENO2 和 ENO3。ENO1 的基因产品是非神经烯醇化酶（NNE 或 α ），其广泛分布于不同的哺乳动物组织中。ENO2
10 的基因产品是肌肉特定的烯醇化酶（MSE 或 β ），其主要位于心脏肌肉和纹状肌肉中。ENO3 基因的产品是神经元特异的烯醇化酶（NSE 或 γ ），在神经元和神经内分泌细胞中可以大量发现它们。天然酶可指定为由免疫学上可区分的三个亚基 α 、 β 和 γ 组成的同构或异构重组体。每个亚基（ α 、 β 和 γ ）的分子重量分别为 16kDa、44 kDa 和 46 kDa。

15 已被指定为神经元特异性烯醇化酶的 $\alpha\gamma$ 和 $\gamma\gamma$ 烯醇化酶异构重组体每个分子量大约为 80,000 道尔顿。可以看到在大脑受到损坏（例如敲击，脑外伤）后脑脊髓液和血液中的烯醇化酶浓度增加，并且从受损的脑组织中释放到脑脊髓液和血循环中的烯醇化酶反应了脑组织受损的程度。烯醇化酶具有大约 48 小时的生物半衰期。

20 S100 蛋白质是细胞质的酸性钙结合蛋白，其主要在大脑灰色物质中，并主要在星形胶质细胞和施旺（Schwann）细胞中。蛋白质存在于几个由两个免疫学上不同的亚基 A1（分子量 10,400 道尔顿）和 B（分子量 10,500 道尔顿）组成的均键或异键异构重组体中。在中央神经系统（CNS）中，同型二聚体 S100 B-B（21,000 道尔顿）和异型
25 二聚体 S100 A1-B（20,900 道尔顿）构成了 S100 的 95% 以上（Isobe 等，Biochem Int 1983; 6: 419, Zimmer 等人，Brain Res Bull 1995; 37: 417）。既然在大脑中发现了高比例的 S100B，一些研究就把 S100 蛋白作为脑受损标记物来测定。S100B 的生物半衰期为 113 分钟（Usui 等人，Clin Chem 1989; 35: 1942）。S100B 血清水平的重复测量有

利于神经破坏过程的监测。

谷氨酰胺合成酶 (GS) 是无所不在的酶, 它催化以氨作为氮源的依赖 ATP 的从谷氨酸盐到谷酰胺的转化。GS 在肝、肌肉、肾和脑中的浓度较高 (De Groot 等人, *Biochim Biophys Acta* 1987; 908: 231)。人类大脑中的 GS 是星形胶质细胞特异性的酶, 该酶通过将潜在的神经毒性的谷氨酸盐和氨转化成谷酰氨来保护神经元。

GS 的二价阳离子位点使它对氧化极敏感。

AD 患者大脑中老年斑的浓稠区域体现了增加的氧化应力环境, 并且 AD 患者大脑中的蛋白质比控制人群的蛋白质更易氧化。大量出现在老年斑区域的反应性的微神经胶质细胞被认为是大脑中氧化自由基的来源。

已知有三种不同类型的 GS: GS I、GS II 和 GSIII。在细菌中发现了 GS I 和 GS II 的基因。人 GS 基因属于 GSIII 类型 (Brown 等人, *J Mol Evol* 1994; 38: 566)。大脑中的 GS 被认为是以分子量为 360,000-400,000 道尔顿的八聚物结构存在 (Tumani 等, *J Immunol Meth* 1995; 188: 155)。但血液循环中的蛋白质被认为是 MW44±1kDa 的单体形式 (Boksha 等人, *J Neurochem* 2000; 75: 2574)。AD 患者的腰脑脊髓液 (CSF) 的 GS 浓度高已有报道 (Gunnensen 和 Haley, *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11949, Tumani 等人, *Arch Neurol* 1999; 56: 1241)。

导致脑脊髓液中谷氨酰胺合成酶浓度增加的准确机理还不知道。已有研究人员提出在反应性的星形胶质细胞中 GS 表达过量并接下来释放到细胞外的空间中 (Tumani 等, *Arch Neurol* 1999; 56: 1241)。

在本发明的一个深入研究的实施方式中, 在进行分析时, 体液样本可以按期从患者的一个位点或按期从不同位点提取。典型地, 第一个样本从出现 AD 疑似症状的患者那提取并根据本发明进行分析。然后在此次提取的一段时间之后, 例如距第一次提取约 3-6 个月之后, 提取第二个样本并根据本发明进行分析。分析数据可用于诊断 AD、排除 AD、将 AD 和非 AD 痴呆中加以区分。

虽然在一个样本中可以测量一个或多个标记物，但我们所关注的患者体液的三个特异标记物中的任何一个或三个全部的水平从单一样本中可以测量出来。“样本”是指体液例如血液或脑脊髓液。所有标记物都可以用一个分析设备测量，或通过针对每个标记物而分离分析的设备进行测量，该设备中可以使用相同病例样本的等分试样。无论分析是在一个单独分析设备上进行还是在分离的设备上进行，优先依次选择测量相同单个样本中三个标记物的每一个，这样每个标记物的水平在一个样本中几乎同时出现，可用于提供更有意义的数

5 使用每个标记物的特异性抗体和检测标记物与每个抗体的特异性联系，这决定了每个标记的存在。可使用任何合适的直接或间接的方法，包括那些商业上采用的，根据本发明测定的每个特异性标记物水平的方法。分析可以是竞争性分析、交叉性分析，并且标记可选自于已知的标记组例如放射免疫测定、荧光或化学荧光免疫测定或免疫聚合酶链反应技术。由于这些都是本领域成熟的技术，因此在这里不需要对已知的免疫分析技术作更多的讨论。见 Takahashi 等人对 S100B 的分析 (Clin Chem 1999; 45 (8): 1307)。

虽然不限于此，但本实施例中使用的免疫测定方法包括分析样本中 10 标记蛋白质水平的双抗体或夹心酶联免疫吸附测定 (ELISA)。根据这个方法，抗体中的一个，是“捕捉”抗体，其固定在固相上，另一个是“检测抗体”，可用酶等物质对其进行标记。检测抗体同捕捉抗体及连接于其上的标记蛋白连接组成了夹心结构。对三个标记物的每项分析来说，使用标记蛋白标准制作相对于标记蛋白浓度的标准吸附曲线或校准吸附曲线。除了优选实施方式的优点以外，附加的标记物 NSE 和 S100B 分别在表示神经元的不间断破坏和检测大脑中的急性事件 25 方面起辅助作用，因此本方法是很重要的。

由于测量标记蛋白的分析方法应呈现出足够的敏感性以能测量出病人的超过健康人体内正常浓度范围的每种蛋白质的升高水平，即高于正常 (=断点) 以上两个方差或更高。对 GS 蛋白质来说，断点 = 0.022ng/ml, NSE = 8.34ng/ml, S100B = 0.02ng/ml。

分析可以不同的形式进行,包括优选以成批方式进行分析的微孔板法。分析也可在本领域已知的自动分析器中进行。另一个可用于本发明的分析方式是快速人工试验,其可在任何位置进行临床检测。特别是,这样的设备将提供高于或低于断点的结果,即半定量结果。

5 人重组 GS (rhGS) 的表达和单克隆抗体的分离

为了分离对人谷氨酰胺合成酶(人类重组 GS 或 rhGS)有特异性的抗体(GS),从美国模式培养物保藏所(ATCC)购得的 rhGS 的 cDNA。通过 PCR 和亚克隆 pET28a (*NdeI/ShoI*) 的方式获得了 rhGS 开放阅读框的全长度。构造包括在 rhGS 开放阅读框的 N 末端的组氨酸标记,而在 C 末端没有额外序列。该蛋白在 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 表达, Listrom (Biochem J 1997; 328: 159) 等人作了以下的技术表述。原细胞提取物的制备和在尿/碱处理中组成的溶解性表达产品的溶解通过 Moreno 等人 (J Comp Neurol 1994; 350: 260) 的方法获得。亲和性纯化通过供应商推荐的镍离子亲和层析柱 (Ni-NTA) 的
10 色谱法进行。
15

单克隆抗体的制备

本发明中的单克隆抗体通过聚乙二醇 (PEG) 为介质的细胞融合法而制备。

免疫体的制备

20 Balb/c 鼠,来自于加拿大魁北克市 Constant 街 Charles River Canada 的 H-2^d 单倍型种系,雌性,7-9 周大,在等体积量的两个福氏佐剂之一的福氏完全佐剂 (FCA) 中乳化 rhGS,用该 rhGS 对 Balb/c 鼠进行初次免疫注射,加不完全福氏佐剂 (FIA),以 2-4 周为间隔,剂量为 25-100 μ gGS,进行连续的免疫注射。最后在 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲剂 (PBS) 中,经免疫的鼠在静脉内和/或腹膜内的最后一次
25 免疫注射的 3-4 天后死去。

杂交瘤的制备

GS 蛋白免疫鼠的脾细胞和 Sp2/0 细胞根据由 Fuller, SA, Takahashi, M 和 Hurrell, JGR 描述的方法在 42%PEG 的条件下融化。

(单克隆抗体的制备: In: Susubel F, Brent B, Kingston R., 等人, eds. Current Protocols in Molecular Biology. New York: Greene Publishing Associates, 1987: Unit 11)。得到的融化细胞在 HAT 选择培养基中悬浮并分布到四个 96 目的板上, 该板如 Fuller 等人描述的那样 (见上述参考文献) 用进料细胞、腹膜分泌液细胞 (PEC) 5 预种。

GS 特异的抗体分泌杂交瘤的筛选

通过两个方法进行杂交瘤培养物的筛选。(1) 固相酶联免疫吸附测定 (ELISA) - 筛选酶联免疫吸附测定 (ELISA): 融合的杂交瘤培养物上清液加入到 96 目的微孔板中 (NUNC Maxisorp, GIBCO BRL), 该 10 盘在 pH 值为 9.6 的 100mM 碳酸盐缓冲剂中用 $2 \mu\text{g/ml}$ 的 rhGS 覆盖。连接点的过量用 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲剂 (PBS) 中的牛血清白蛋白 (BSA) 阻滞。用含 0.05% 吐温 20 (WB) 的磷酸盐缓冲剂清洗盘之后, 含单克隆抗体的 $100 \mu\text{L}$ 悬浮培养物在 37°C 用固定抗原培养 1 小时。 15 清洗后, 添加结合山羊的抗鼠 IgG 的过氧化物酶 (Jackson ImmunoResearch Lab, Inc., West Grove, Pa.), 并在室温下 (RT) 在轨道振动器上培养 30 分钟。清洗后, 添加四甲基联苯胺 (TMB) 酶解物溶液 (Sigma)。在黑暗、室温的条件下培养 5 分钟后, 用 1 摩尔 H_2SO_4 停止反应并在 450_{nm} (纳米) 读取光学密度。选择性的阳性培养物, 用 Fuller 等人描述的限制性稀释方法克隆 (见上述参考文献)。 20 对扫描酶联免疫吸附测定 (ELISA) 筛选和克隆程序进行重复, 直到获得培养物的稳定性和同源性 (clonality)。(2) 筛选 ELISA-2: 在第二个方法中, 杂交瘤悬浮培养物中的单克隆抗体被在 ELISA 盘固相上的山羊抗鼠 IgG_{Fc} 捕获。在 37°C 培养 1 小时后, 如方法 1 所述方式清洗盘。然后把在磷酸盐缓冲剂 (PBS) 中用 0.5% 牛血清白蛋白 25 (BSA) 稀释为 1/2000 稀释物的生物素标记的 GS 添加到每一目中。于室温下在振动器上培养 30 分钟后, 清洗盘并以 1/10,000 的比例添加过氧化物酶 (HRP) 结合的抗生物素蛋白链菌素 (Boehringer Mannheim) 并在室温下培养 30 分钟。清洗后, 添加四甲基联苯胺酶

解物溶液并按方法 1 所述方式读取反应。

为进行酶联免疫吸附测定,选择了指定为 1G3 和 5G4 的两个无性繁殖细胞系。根据布达佩斯条约,这些无性繁殖细胞系于 2001 年 4 月 25 日在编号分别为 PTA-3339 和 PTA3340、存放于 10801 University Blvd., Manassas, VA20110-2209 的美国模式培养物保藏所中。根据 37CFR1.808,存放人保证,专利授权将不可恢复地免除所有对存放材料公众可用性上的限制。

单克隆抗体的制备

使用腹水制备的 GS 特异性的单克隆抗体。腹水产自于 Balb/c 鼠,用腹腔注射 0.25ml 降植烷作为预处理,再于腹腔注射 PH7.4 的 0.25-0.5ml 磷酸盐缓冲剂,其中含 $1-5 \times 10^6$ 个杂交瘤细胞。10-14 天后,收集腹水。来自腹水的单克隆抗体使用已知手段在亲和柱(蛋白质 G, AVIDAL)上纯化。纯化后的单克隆抗体用于免疫化学研究。

多克隆抗体的制备和纯化

通过两周一次的肌肉和/或皮下注射 250-500 μ g 用福氏助剂乳化的纯化 rhGS 来对山羊进行免疫。通过半交叉酶联免疫吸附测定筛选血清的方式常规监测滴定。GS 特异性的多克隆抗体(PAb)接下来通过使用溴化氰活化的偶合到重组物 GS 上的琼脂糖-4B (Pharmacia 公司),经亲和纯化方式从山羊血清中纯化。纯化后的多克隆抗体以 pH 为 7.4 的 10mM 的磷酸盐缓冲剂为参照进行透析,用超滤法浓缩并在 -20°C 下储存。

生物样本的诊断分析和其中 GS 的检测

本发明的另一个目的是为阿尔茨海默病患者提供 GS 检测诊断分析用的试剂。

在这个实施方式的一种形式中,本发明的 GS 可作为抗原用于检测已患 AD 人群的免疫分析中的抗原。蛋白质(本发明中的 GS)可用于领域中已知的任何免疫检测系统,包括但不限于:放射免疫测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)、“交叉”检测、沉淀素反应、凝胶扩散免疫扩散、凝集试验、荧光免疫测定、蛋白质 A 或 G 免疫测定和免疫

电泳测定。根据本发明，抗人 GS 的单克隆或多克隆抗体用于血样本或血产品例如血清、血浆或类似物质、脊髓液或其他体液如唾液、尿、淋巴液和类似物质的免疫测定以便诊断 AD 患者。阿尔茨海默痴呆症可通过单独或结合使用单个单克隆抗体或多个单克隆抗体来进行确定，这些抗体对人谷氨酰胺合成酶呈特异性。

以上抗体可用于任何类型的免疫测定。这包括两点交叉测定和非竞争型的单点免疫测定和传统的竞争结合测定。

为了将检测简易化并确保其定量性，特别优选交叉测定或存在大量变化的双抗体测定，它们都是本发明所细致考虑的。例如在传统的交叉分析中，未标记的抗体在固相（例如微孔板）上固定，并添加所测定的样本。在抗体-抗原复合体形成的一段培养期之后，添加标记了能感应可检测信号的指示分子的第二个抗体，并持续培养足够时间以在不同的位置结合抗原，得到抗体-抗原-标记抗体复合物的形式。通过信号观察确定抗原的出现，将该信号与包含已知量抗原的控制样本对比来量化。

临床研究

在三个老年病学诊所进行预期观测的试点研究。该研究评价了就诊的 38 个患者，该诊所进行简易智能状态检查（MMSE）和其他常规测试。其中，24 人诊断为 AD，14 人诊断为其他类型的非 AD 痴呆。在 54-87 年龄范围内，呈现阿尔茨海默痴呆的患者的平均年龄为大约 79 岁。记录了简易智能状态检查的得分（MMSE）。获得血样，凝结之后离心样本，分离血清并等分保存在 70°C 下直到进行 S100、NSE 和 GS 的分析。

控制对象包括 153 个健康血液志愿者（年龄范围为 18-87 岁，平均年龄为 71.03±9.95 岁），他们的血样用于确定 S100、NSE 和 GS 浓度的参考值。

阿尔茨海默病被看作是一种发展性的疾病过程，其从基本的新大脑皮层开始，传播到脑中的海马，最终分布到所有的皮层区域。疾病过程中没有缓解（Braak 和 Braak, Neurobiol Aging 1997; 18 (4):

351)。这说明 AD 是一个疾病过程，而不仅仅是年龄的产物。AD 的发病机理涉及神经元稳定而持续的破坏。虽然烯醇化酶并非 AD 所特有，该标记物还是可作为神经元被不断破坏的的指示剂。当在非脑脊髓液中分析蛋白质的时候，利用即刻揭示人 GS 的单克隆抗体，精巧、敏感并具有特异性的 AD 测定就成为可能。这与以前的技术分析不同，以前测定技术中的标记物特定于非人 GS，并不能从血清或其他任何非脑脊髓液体液中获得决定性数据。S100 不具备敏感性，但它是监测大脑中急性事件（例如短暂性脑缺血（TIA）、敲击、导致局部缺血的氧不足）的有利标记物，这些事件在 AD 目标人群的老年个体中是常见的。

报道的所有参考值是平均+2SD。三个标记物的参考值是：GS=0.022ng/ml，NSE=8.34 ng/ml，S100=0.02 ng/ml。

使用来自加拿大，Ont，Mississauga 的 Syn-X Pharma 公司生产的 SMART S100 和 SMART NSE EILISA 检测试剂盒分别分析 S100 和烯醇化酶的水平。对 GS 分析来说，在 Syn-X Pharma 处制备抗体试剂和标准液（即重组人类 GS）。如上所述进行酶联免疫吸附测定测定。

图 3 中的柱形图曲线描述了基于年龄进行分类的健康个体的 GS 蛋白质血清浓度的分析。有趣的是，60 岁的个体相对于其他较年轻的群体，其血液中的 GS 水平明显较高。但是 70+ 群体血液中的平均 GS 水平与在 20 岁和 40 岁年龄群观察到的情况相比似乎呈下降趋势。观察 S100 蛋白质，其模式相似。另一方面，烯醇化酶血清浓度的年龄分布与其他两个标记不同，其在 14—40 年龄组观察到的浓度明显偏高。这三个蛋白质的血清水平与性别没有关系。虽然不希望与任何特定理论相联系，但假定具有升高 GS（和/或 S100）的 60 岁人群确实已经正在形成脑退化、将 70 岁的这样的个人归类为“患者”，剩余的所谓“健康”个人则很符合身心健康标准，他们的这些蛋白质标记呈现低水平。这样，可以得出结论，对风险评价研究的诊断来说，关注 60 岁年龄组的 GS 水平特别有价值。

在 24 个基于 MMSE 的 AD 血清样本中，20 个是轻度的 AD 病例，4

个是中等程度的（见图 1）。三个标记物即 GS、NSE 和 S100B 的敏感度分别为 100%、33%和 8%。GS 水平与 AD 的严重程度（即 MMSE 得分）相关联，而从烯醇化酶水平上却观察不到相似的联系。S100 的敏感度非常低，但是，当这个标记升高时，它可成为由急性事件造成的大脑中星形胶质细胞被不断破坏的指示。

在 14 个非 AD 痴呆样本中，仅有一个 GS 和 S100 的水平均呈现升高，而 7 个样本的烯醇化酶浓度超过断点水平（图 2）。这表明 GS 和 S100 是 AD 高特异性的标记。

在本说明书中提到的所有专利和出版物都是表示与本发明相关的技术的成熟程度。像每个出版物都特别且独立地表示为与参考文献相结合一样，这里的所有专利和出版物都在相同的程度上与参考文献结合。可以理解虽然本发明的某一形式是举例说明的，但它并不限于这里描述和展示的特定形式或部分安排。很明显，本领域那些不断变化的成熟技术在不脱离本发明范围的情况下都可以使用，并且不认为本发明被限制在说明书和附图所描述和展示的内容之内。

熟悉本领域的人将很容易体会到本发明是非常易于操作达到目标并获得前述提及的结果、优点及其他内在特点的。这里描述的低聚核苷酸、肽、多肽、生物学相关的化合物、方法、步骤和技术，呈现的是优选的代表性实施方式，目的在于举例说明而不在于限制范围。本发明实质范围所包括的技术和附加权利要求书范围所定义的技术中，其变化和其他使用能为本领域的熟练技术人员所想到。虽然结合具体优选的实施方式描述了本发明，但可以理解要求保护的发明将不是过度限制在这样的具体实施方式中的。实际上，对本领域技术人员来说显而易见的所述本发明实施方式的各种变换形式都意图包括在下列权利要求范围内。

AD 样品 (血清)

Syn-X 编码	年龄	性别	S100B (ng/ml) 断点 =0.02	NSE(ng/ml) 断点 =8.34	GS (ng/ml) 断点 =0.022	20-30 轻度 22 个轻度 AD	10-19 中度 14 个中度 AD	历史, 诊断: MMSE 0-9 重度
ADH-011	66	男	0.010	9.065	0.058	22 个轻度 AD		
ADH-012	79	男	0.008	4.253	0.023	14 个中度 AD		
ADH-013	76	男	0.005	6.166	0.068	17 个中度 AD		
ADH-014	85	女	0.009	4.784	0.162	17 个中度 AD		
ADH-015	81	男	0.011	8.608	0.058	25 个轻度 AD		
ADH-016	83	女	0.009	14.679	0.077	22 个轻度 AD		
ADH-017	84	女	0.015	10.724	0.092	22 个轻度 AD		
ADH-018	87	女	0.011	4.651	0.042	21 个轻度 AD		
ADH-019	74	女	0.010	6.211	0.131	22 个轻度 AD		
ADH-020	74	男	0.004	3.504	0.035	25 个轻度 AD		
ADH-021	77	男	0.006	1.888	0.045	20 个轻度 AD		
ADH-022	84	男	0.010	4.784	0.049	23 个轻度 AD		
ADH-023	79	男	0.009	7.698	0.052	27 个轻度 AD		
ADH-024	87	男	0.014	8.699	0.071	20 个中度 AD		
ADH-025	75	女	0.009	5.853	0.036	21 个轻度 AD		
ADH-026	79	女	0.006	6.750	0.043	24 个轻度 AD		
ADH-027	81	男	0.005	3.284	0.048	23 个轻度 AD		
ADH-028	54	男	0.006	4.121	0.022	21 个轻度 AD/poss VaD		
ADH-029	82	女	0.004	12.969	0.080	23 个轻度 AD		
ADH-030	81	女	0.009	4.563	0.048	24 个轻度 AD		
ADH-031	83	女	0.009	16.316	0.067	20 个轻度 AD		
ADH-032	84	女	0.017	3.460	0.029	24 个轻度 AD		
ADH-033	87	女	0.020	2.628	0.067	21 个轻度 AD		
ADH-034	74	女	0.022	9.111	0.070	22 个轻度 AD		
敏 感 度			8 %	33 %	100 %			

图 1

非-AD 痴呆控制

DC-1

Syn-X 编码	年龄	性别	S100B (ng/ml) 断点=0.02	NSE (ng/ml) 断点=8.34	GS (ng/ml) 断点=0.022	历史, 诊断	
DC-001	86	男	0	3.816	0.019	轻度痴呆	
DC-002	69	男	0	3.816	0.008	轻度痴呆 (dementia) (AS), 咽痛	
DC-003	74	女	0	28.097	0.010	重度痴呆 (AS)	
DC-004	52	男	0	5.831	0.003	VaD	
DC-005	61	女	0.007	6.220	0.016	FTD, 渐进的说话问题	
DC-006	75	男	0.015	5.261	0.011	VaD, 甲状腺机能减退	
ADH-009	86	女	0.009	4.386	0.02	痴呆, 类型未知	
ADH-037	78	男	0.008	10.585	0.042	LBD	
AD-042	78	男	0.001	8.146	0.015	16 个中度 VaD	
AD-069	86	女	0.002	15.731	0.015	25 个轻度 VaD	
AD-078	56	男	0.004	17.589	0.010	21 个轻度 FTD	
AD-082	72	女	0.017	24.562	0.019	26 个轻度 MCI	
AD-084	51	女	0.011	10.515	0.006	4 个重度 FTD	
AD-086	67	女	0.025	32.101	0.013	20 个轻度 CBD	
敏 感 度						93 %	93 %

MCI: 轻度认知能力损坏, CBD: 皮层基础退化, FTD: 额 - 瞬时痴呆, VaD: 血管痴呆
LBD 或 DLBD: 带有 Lewy 体的痴呆 (dementia with Lewy bodies)

图 2

与年龄相关的谷氨酰胺合成酶水平

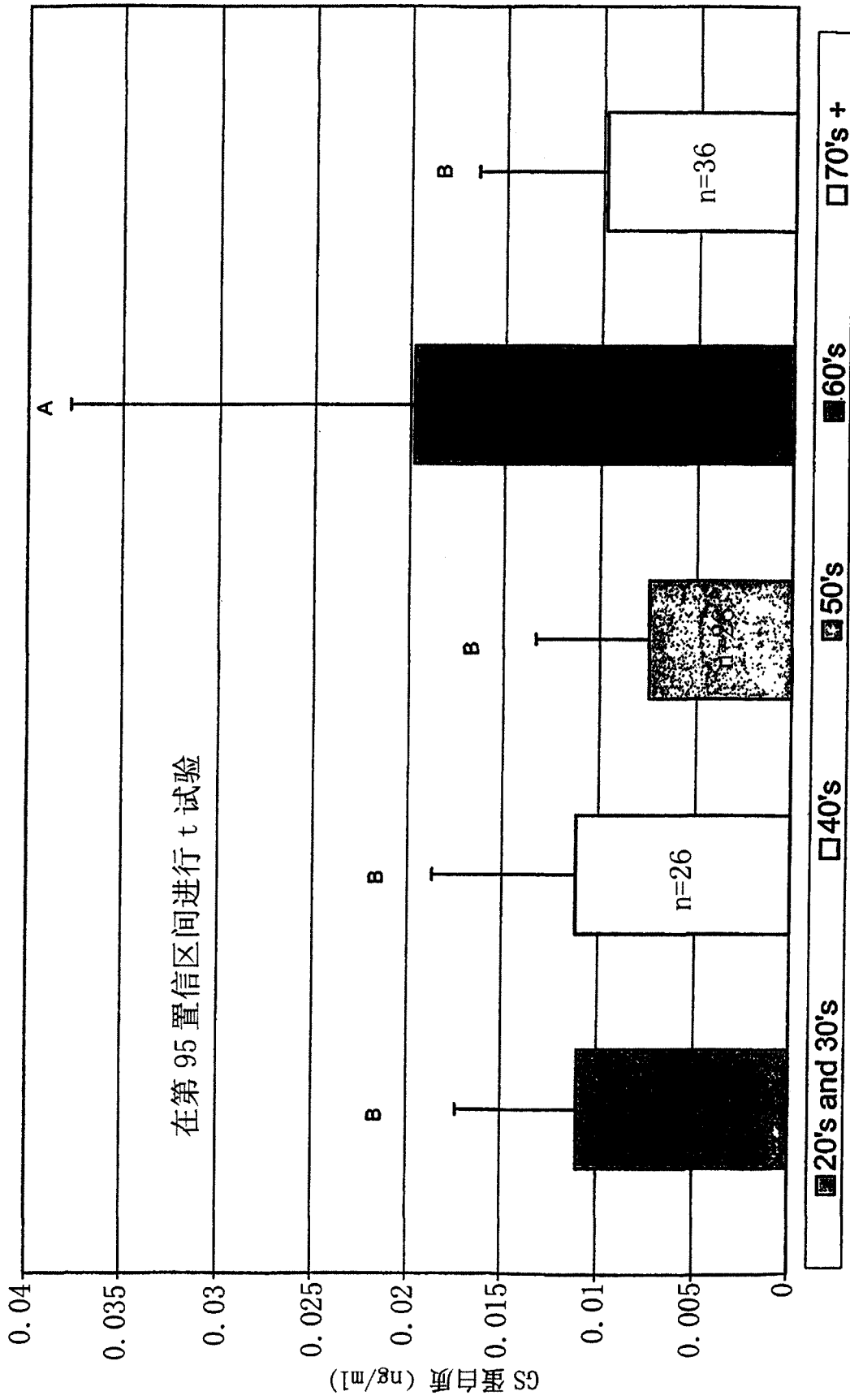


图 3

专利名称(译)	阿尔茨海默病的鉴别治疗方法及其设备		
公开(公告)号	CN1543571A	公开(公告)日	2004-11-03
申请号	CN02811648.8	申请日	2002-04-24
申请(专利权)人(译)	SYN.X医药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	SYN.X医药有限公司		
[标]发明人	乔治亚茨科夫斯基 米约科塔卡哈希		
发明人	乔治·亚茨科夫斯基 米约科·塔卡哈希		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/40 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/48 G01N33/566 G01N33/573 G01N33/577 G01N33/68 C12N5/12		
CPC分类号	G01N33/573 G01N2333/988 G01N2333/9015 G01N33/6896 G01N2333/4709 C07K16/40 G01N2800 /2821 G01N2333/4727 C07K2317/20		
代理人(译)	张金海		
优先权	09/842079 2001-04-25 US 09/971740 2001-10-04 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种阿尔茨海默病(AD)的诊断方法。该方法包括直接检测体液中生化标记物、特别是人谷氨酰胺合成酶的存在，其中体液尤其指血液或血产品。检测是通过结合对人谷氨酰胺合成酶特异的抗体进行免疫测定而实现。此外，还公开了一种区分AD和非-AD痴呆的方法。

与年龄相关的谷氨酰胺合成酶水平

